

doi:10.11937/bfyy.20171343

吴茱萸多酚的酶法提取工艺及其 抗氧化抑菌活性

王明华¹, 邵明亮¹, 高子怡², 郝丽琴², 赵二劳²

(1. 忻州师范学院 生物系, 山西 忻州 034000; 2. 忻州师范学院 化学系, 山西 忻州 034000)

摘 要:以吴茱萸为试材,在单因素试验的基础上,通过正交实验对吴茱萸中多酚的酶法提取工艺进行了优化,采用清除 DPPH· 法评价了吴茱萸多酚的抗氧化活性,利用滤纸片法研究了吴茱萸多酚的抑菌活性。结果表明:吴茱萸中多酚酶法提取的最佳工艺为提取温度 60 ℃、提取时间 2.5 h、纤维素酶浓度 0.25 mg·mL⁻¹、pH 4.0。在此工艺条件下,吴茱萸多酚提取率为 5.58%。吴茱萸多酚清除 DPPH· 的能力弱于维生素 C,但也具有一定的抗氧化活性。吴茱萸多酚对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌均具有抑制作用,抑制作用大小顺序为大肠杆菌>枯草芽孢杆菌>金黄色葡萄球菌。吴茱萸多酚具有作为天然抗氧化剂和食品防腐剂的应用前景,值得进一步研究开发。

关键词:吴茱萸;多酚;酶法提取;抗氧化活性;抑菌活性

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)22-0126-06

吴茱萸(*Euodia rutaecarpa* (Juss) Benth.) 属芸香科吴茱萸属落叶灌木或小乔木,又名淡茱

第一作者简介:王明华(1982-),女,博士,讲师,研究方向为天然产物化学。E-mail:441548507@qq.com

责任作者:赵二劳(1952-),男,本科,教授,现主要从事天然产物化学的教学与科研等工作。E-mail:zel0350@163.com

基金项目:国家级大学生创新创业训练计划资助项目(201610124001);山西省高等学校大学生创新创业训练计划资助项目(2016381);忻州师院化学化工创新基地资助项目(2017)。

收稿日期:2017-07-10

萸、吴萸、米辣子等,原野生于浙江、江西、贵州、四川、陕西、云南等温热地的路旁、山地或疏林下,现湖南、云南、四川、贵州等地有较多人工种植栽培^[1],资源丰富。中药吴茱萸是指吴茱萸及其变种石虎或疏毛吴茱萸的干燥近成熟果实,为常用中药。吴茱萸始载于《神农本草经》,被列为中品,其味辛苦、性大热,有温中散寒、疏肝下气、助阳止泻、燥湿定痛之功效^[2]。现代科学研究表明^[3],吴茱萸中含有多酚,具有抗氧化、抗病毒、抑菌、降压和防治肥胖等作用。多酚作为植物次生代谢产物,具有多种药理功效和生物活性,被喻为“第七大营养物质”^[4-5],广泛应用于食品、医药和化妆品

content of roots by 39.26%. Treatment using 2 g·L⁻¹ copper-based foliar fertilizer containing potassium iodide (CBFF-KI2) increased the soluble protein content in roots by 37.87%. Treatment of 1 g·L⁻¹ (CBFF-KI1) decreased iodine content in roots by 44.38% and vitamin C content of root by 23.75%. CBFF-KI1 and CBFF-KI2 treatments significantly increased nitrite content by 53.95% and 92.68%, respectively. In conclusion, applying copper-based foliar fertilizer containing potassium iodate with a spraying concentration of 1 g·L⁻¹ was recommended for radish cultivation.

Keywords: radish; iodine; copper; biological effects

等领域。研究吴茱萸中多酚的提取及其功能活性,对于开发吴茱萸新产品、提高吴茱萸的经济价值、拉长吴茱萸产业链有重要的实际意义。

目前国内关于吴茱萸功能成分提取研究的报道较多,如温双双等^[6]采用正交实验法研究了吴茱萸挥发油水蒸气蒸馏提取;杨文婷等^[7]研究了吴茱萸生物碱的超声波提取工艺;郭殷锐等^[8]研究了吴茱萸碱和次碱的闪式提取工艺;郭青枝等^[9]则研究了吴茱萸防晒成分的超声波提取;徐澜等^[10]采用响应面法优化了吴茱萸多糖的微波提取工艺;刘应姣等^[11]则对水蒸气蒸馏法、索氏提取和超声提取吴茱萸挥发油成分进行了比较研究。但有关吴茱萸多酚提取及其活性的研究鲜有报道,特别是吴茱萸多酚的酶法提取研究尚鲜见报道。为此,该研究以纤维素酶辅助提取吴茱萸多酚,采用正交实验法优化确定提取工艺,并初步研究吴茱萸多酚的抗氧化及抑菌活性,以期吴茱萸资源的进一步开发研究利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料吴茱萸购于忻州市本草堂,在烘箱中 50℃ 烘干后,粉碎过 40 目筛,备用。没食子酸、维生素 C、碳酸钠、氢氧化钠、盐酸、无水乙醇、福林-酚试剂等均为分析纯。纤维素酶(酶活力 20 000 U·g⁻¹,天津利华酶制剂厂);牛肉膏、蛋白胨、琼脂等为生化试剂。

供试大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌均由忻州师范学院生物系微生物实验室提供。

SP-723 型可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);pH 计、AL 204 电子天平(梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司);SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台(苏州净化设备有限公司);SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市子华仪器有限公司);HH-6 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);LG-4016 低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 吴茱萸中多酚提取率的测定

以没食子酸为标准,采用 Folin-Ciocalteu 比色

法测定吴茱萸中多酚提取率。按参考文献[12-13]方法稍作改动,精确吸取 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL 质量浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 没食子酸标准溶液,分别置于 8 支 10 mL 比色管中,依次加入约 3 mL 水,1 mL Folin-Ciocalteu 试剂和 4 mL 15% 的 Na₂CO₃ 溶液,水定容至刻度,摇匀,于 50℃ 水浴中反应 30 min,取出冷却后,在最大波长 760 nm 处测定吸光度。以没食子酸质量浓度 $C(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标,吸光度 A 为纵坐标,得标准曲线回归方程 $A = 0.124C - 0.0172$, $R^2 = 0.9994$ 。没食子酸质量浓度在 1.0~8.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内与其吸光度呈良好线性关系。由标准曲线回归方程计算吴茱萸中多酚提取液中多酚的浓度,并按下式计算吴茱萸中多酚提取率。提取率(%) = 多酚提取量/吴茱萸量×100。

1.2.2 吴茱萸多酚酶法提取的单因素试验

在多次预试验的基础上,以 0.5 g 吴茱萸、提取剂体积 40 mL、提取温度 50℃、提取时间 1.5 h、纤维素酶浓度 0.15 mg·mL⁻¹ 和提取剂 pH 4.0 为基础条件,分别考察提取温度(30、40、50、60、70℃),提取时间(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h),纤维素酶浓度(0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mg·mL⁻¹),提取剂 pH(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0) 4 个因素对吴茱萸多酚提取率的影响,选定各因素对吴茱萸多酚提取率影响较大的水平。

1.2.3 吴茱萸多酚酶法提取的正交实验

根据单因素试验结果,选取提取温度、提取时间、酶浓度和 pH 为影响因素,每因素选定 3 个水平,设计 L₉(3⁴) 正交实验,优化吴茱萸多酚的酶法提取工艺。正交实验因素和水平见表 1。

1.2.4 吴茱萸多酚抗氧化活性的研究

DPPH· 是一种稳定的有机自由基,清除 DPPH· 法因适应性强、操作简单、重现性好,被广泛用于物质抗氧化活性的评价中。试验以常用抗氧化剂维生素 C 为阳性对照,参照文献[14]方法,稍作改动进行。在 10 mL 比色管中,加入 2.0 mL 质量浓度为 0.25 mg·mL⁻¹ 的 DPPH· 溶液,再加入定量的吴茱萸多酚溶液,水定容至刻度,室温下避光反应 40 min 后,于最大波长 517 nm 处测定吸光度,计算清除率、半清除率(IC₅₀)。清除率(%) = $[1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100$ 。A₀ 为未

表 1

正交实验与水平

Table 1

Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	因素 Factor			
	A 提取温度 Extraction temperature/°C	B 提取时间 Extraction time/h	C 纤维素酶浓度 Cellulase concentration/(mg · mL ⁻¹)	D pH
1	40	1.5	0.15	4.0
2	50	2.0	0.20	5.0
3	60	2.5	0.25	6.0

加吴茱萸多酚溶液体系的吸光度; A_i 为加入吴茱萸多酚溶液后体系的吸光度; A_j 为只加吴茱萸多酚溶液体系的吸光度。

同法测定维生素 C 溶液对 DPPH · 的清除率,用半清除率(IC_{50})定量比较吴茱萸多酚与维生素 C 对 DPPH · 的清除能力,即抗氧化活性。

1.2.5 吴茱萸多酚抑菌活性的研究

试验以日常生活中常见的腐败细菌金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和大肠杆菌为供试菌。将该 3 种细菌分别接种于营养琼脂斜面培养基上,在 37 °C 恒温培养 24 h,连续活化培养 3 次。参考文献[15]的方法测定吴茱萸多酚抑菌活性。将牛肉膏蛋白胨培养基制成带菌平皿,直径 6 mm 浸有吴茱萸多酚不同质量浓度的滤纸片分别贴于平皿的外围,每皿 4 片,浸有无菌水的滤纸片贴于中央,做为阴性对照,然后将贴好滤纸片的平皿倒置于恒温培养箱中,37 °C 恒温培养 24 h。吴茱萸多酚每种浓度均设 3 次重复,观察并测量抑菌圈直径取平均值。阴性对照抑菌圈直径应小于或等于 6.0 mm,否则试验无效。

1.3 数据分析

试验均重复 3 次,结果取平均值。采用 Excel 2003 软件作图和分析。

2 结果与分析

2.1 提取温度对吴茱萸多酚提取率的影响

由图 1 可知,随提取温度的升高,吴茱萸多酚提取率增大,当提取温度为 50 °C 时,多酚提取率达到最大。以后继续升高提取温度,多酚提取率逐渐下降。其原因可能是提取温度升高,纤维素酶活力逐渐增强,纤维素酶分解吴茱萸细胞壁的能力增强,增加细胞壁的通透性^[16],利于多酚溶出,但提取温度过高,会使纤维素酶失活,导致纤

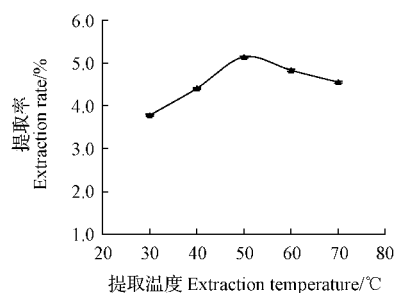


图 1 提取温度对多酚提取率的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperature on extraction rate of polyphenols

维素酶分解吴茱萸细胞壁的能力减弱,多酚提取率降低。所以选取提取温度 50 °C。

2.2 纤维素酶浓度对吴茱萸多酚提取率的影响

由图 2 可以看出,随提取剂中纤维素酶浓度增加,吴茱萸多酚提取率增加,酶浓度增至 0.20 mg · mL⁻¹ 时,吴茱萸多酚提取率达最大,纤维素酶浓度大于 0.20 mg · mL⁻¹ 后,多酚提取率呈下降趋势,但变化不大。原因可能是提取剂中纤维素酶浓度大,作用于吴茱萸细胞壁的酶就多,可较好的酶解细胞壁,利于多酚溶出;酶浓度过高,酶可能已经饱和,底物浓度相对不能饱和,导致酶作用受阻^[17]。所以选择纤维素酶浓度 0.20 mg · mL⁻¹。

2.3 提取时间对吴茱萸多酚提取率的影响

由图 3 可知,随提取时间的增加,吴茱萸多酚提取率呈先迅速增加后趋于平缓的趋势。当提取时间小于 2.0 h 时,随时间增加,吴茱萸多酚提取率增加较快,提取时间大于 2.0 h 时,多酚提取率增加趋于平缓,变化不大。其原因可能是在试验条件下,提取时间达到 2.0 h 时,吴茱萸细胞壁大部分已经被酶解破坏,多酚基本被溶出^[18],再延长时间,多酚溶出很少增加。所以选择提取时间 2.0 h。

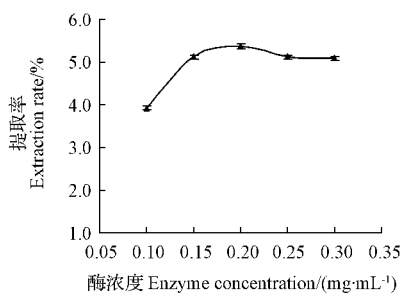


图 2 纤维素酶浓度对多酚提取率的影响
Fig. 2 Effect of cellulase concentration on extraction rate of polyphenols

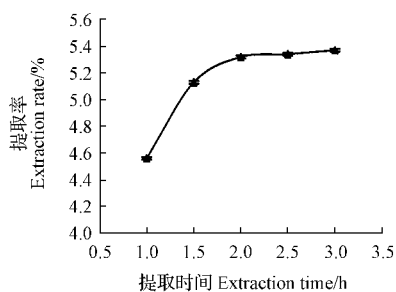


图 3 提取时间对多酚提取率的影响
Fig. 3 Effect of extraction time on extraction rate of polyphenols

2.4 pH 对吴茱萸多酚提取率的影响

由图 4 可知,随提取剂 pH 的增大,吴茱萸多酚的提取率先增加后降低。在 pH 5.0 时,多酚提取率达到最大,这是因为纤维素酶分解植物细胞壁的最佳作用 pH 范围一般在 3.0~5.0,在此 pH 范围内纤维素酶活力最强,可有效酶解破坏吴茱萸细胞壁,使多酚溶出速率加快,多酚提取率提高,提取剂 pH 过高或过低均会使纤维素酶活力降低,导致多酚提取率减少^[17]。所以选择 pH 5.0。

2.5 吴茱萸多酚酶法提取的正交实验结果

由表 2 可知,影响吴茱萸多酚酶法提取率因素的主次顺序为 pH>提取温度>酶浓度>提取时间,优化的最佳提取工艺条件 A₃B₃C₃D₁,即提取温度 60 ℃,提取时间 2.5 h,纤维素酶浓度 0.25 mg·mL⁻¹,pH 4.0。在该工艺条件下,3 次重复试验吴茱萸多酚平均提取率为 5.58%,RSD 为 1.32%。表明该工艺稳定可靠,重现性好。

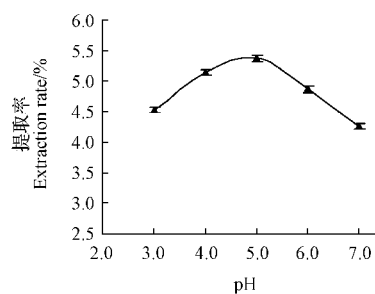


图 4 pH 对多酚提取率的影响
Fig. 4 Effect of pH on extraction rate of polyphenols

表 2 正交实验结果
Table 2 Results of orthogonal experiment

试验号 Test No.	A	B	C	D	提取率 Extraction rate/%
1	1	1	1	1	5.12
2	1	2	2	2	3.86
3	1	3	3	3	3.92
4	2	1	2	3	4.14
5	2	2	3	1	5.44
6	2	3	1	2	4.18
7	3	1	3	2	4.36
8	3	2	1	3	4.23
9	3	3	2	1	5.58
K ₁	4.30	4.54	4.51	5.38	
K ₂	4.59	4.51	4.53	4.13	
K ₃	4.72	4.56	4.57	4.10	
R	0.42	0.05	0.06	1.28	

2.6 吴茱萸多酚的抗氧化活性

由图 5 可知,吴茱萸多酚与维生素 C 对 DPPH·清除率,随其浓度的增加而增强,具有量效关系。对清除率曲线进行线性拟合,求得吴

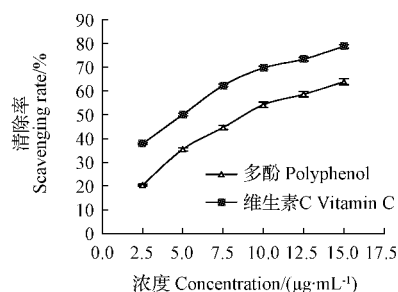


图 5 吴茱萸多酚与维生素 C 对 DPPH· 的清除率
Fig. 5 Scavenging rate of polyphenol from *Evodia rutatecarpa* and vitamin C for DPPH·

茱萸多酚与维生素 C 清除 DPPH· 的半清除 IC_{50} 分别为 $9.89 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与 $5.03 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。虽然吴茱萸多酚清除 DPPH· 能力小于维生素 C, 但吴茱萸多酚具有一定的抗氧化活性。

2.7 吴茱萸多酚的抑菌活性

由表 3 可知, 抑菌圈直径随吴茱萸多酚浓度增加而增大, 表明吴茱萸多酚的抑菌能力与其浓

度具有量效关系。吴茱萸多酚对 3 种供试菌均有一定的抑制作用, 且抑制作用大小顺序为大肠杆菌 > 枯草芽孢杆菌 > 金黄色葡萄球菌。供试菌中既有球菌, 又有杆菌、既有阳性菌, 又有阴性菌, 表明吴茱萸多酚具有广谱抑菌活性。供试 3 种菌为食品加工和贮藏中常见的腐败细菌, 表明吴茱萸多酚具有作为食品防腐剂的应用前景。

表 3

吴茱萸多酚的抑菌活性

Table 3

Antibacterial activity of polyphenol from *Evodia rutatecarpa*

多酚浓度 Polyphenol concentration/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑菌圈直径 Antibacterial circle diameter/mm		
	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>
0.896	—(9.1)	—(8.8)	—(7.4)
0.448	—(8.4)	—(8.0)	—(6.5)
0.224	—(7.6)	—(7.1)	+
0.112	—(7.0)	—(6.6)	+
0.056	—(6.3)	+	+
0.028	+	+	+
0.014	+	+	+

注: 括号中数据为抑菌圈直径(包括滤纸片直径); “—”表示不产菌; “+”表示产菌。

Note: The data in the brackets are the inhibition zone diameter (filter paper diameter included); “—” means no bacteria generated; “+” means bacteria generated.

3 结论

该研究采用纤维素酶辅助提取吴茱萸中多酚, 在单因素分析的基础上, 通过正交实验优化确定最佳提取工艺。结果表明, 影响吴茱萸多酚提取的因素主次顺序为 pH > 提取温度 > 酶浓度 > 提取时间, 最佳提取条件: 提取温度 60°C , 提取时间 2.5 h, 纤维素酶酶浓度 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 4.0。在该工艺条件下, 吴茱萸多酚提取率为 5.58%。抗氧化试验显示, 吴茱萸多酚与维生素 C 清除 DPPH· 的 IC_{50} 分别为 $9.89 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与 $5.03 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 吴茱萸多酚清除 DPPH· 的能力虽弱于常用抗氧化剂维生素 C, 但也具有一定的自由基清除能力, 即具有一定的抗氧化活性。表明吴茱萸多酚具有作为天然抗氧化剂的应用前景。抑菌试验显示, 吴茱萸多酚对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌均具有抑制作用, 抑制作用大小顺序为大肠杆菌 > 枯草芽孢杆菌 > 金黄色葡萄球菌。供试菌中, 既有球菌, 又有杆菌、既有阳性菌, 又有阴性菌, 表明吴茱萸多酚具有广

谱抑菌活性。供试菌均为日常生活中常见腐败菌, 表明吴茱萸多酚具有作为食品防腐剂的应用前景。

参考文献

- [1] 曹小飞, 郭颖, 冉懋雄, 等. 药用植物吴茱萸无公害栽培技术初探[J]. 内蒙古林业调查设计, 2011, 34(2): 16-17, 78.
- [2] 王晓霞, 高慧媛, 姜勇, 等. 吴茱萸化学成分研究[J]. 中草药, 2013, 44(10): 1241-1244.
- [3] 刘佳. 吴茱萸多酚的提取及抗氧化活性研究[J]. 食品工业, 2015, 36(6): 143-146.
- [4] 李丽梅, 何近刚, 关军锋. 梨果心与果皮中多酚提取工艺的研究[J]. 保鲜与加工, 2014, 14(4): 40-44, 48.
- [5] KANG N J, SHIN S H, LEE H J, et al. Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2011, 130(3): 310-324.
- [6] 温双双, 张莉. 正交试验法优选吴茱萸挥发油的提取工艺[J]. 武警后勤学院(医学版), 2012, 21(6): 447-449.
- [7] 杨文婷, 黄士棚, 徐文广, 等. 超声辅助提取吴茱萸生物碱的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(8): 54-57.
- [8] 郭殷锐, 苏雪芬, 张广唱, 等. 正交试验法优选吴茱萸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的闪式提取工艺[J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(3): 380-383.
- [9] 郭青枝, 白建华, 赵二劳. 吴茱萸中防晒成分的提取及其稳

定性研究[J]. 北方园艺, 2009(10): 101-102.

[10] 徐澜, 张鹏飞, 雷丽霞, 等. 响应面法优化微波辅助提取吴茱萸多糖工艺[J]. 中国农业科技导报, 2016, 18(4): 174-180.

[11] 刘应姣, 徐贝, 喻亚飞, 等. 三种不同方法提取吴茱萸果实挥发油成分的 GC-MS 分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(2): 27-30.

[12] 孙海涛, 邵信儒, 姜瑞平, 等. 超声波-微波联合提取山核桃壳多酚及其稳定性[J]. 北方园艺, 2015(24): 135-139.

[13] 王振, 褚敏哲, 薛海波, 等. 超声辅助提取糜子皮多酚工艺条件优化[J]. 保鲜与加工, 2016, 16(5): 41-44, 48.

[14] 王振, 褚敏哲, 薛雅荣, 等. 糜子皮中多酚抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(19): 5-8.

[15] 赵强, 吕伟, 赵二芳, 等. 黄芥籽粕中多酚超声辅助提取工艺优化及其抑菌活性[J]. 中国油脂, 2015, 40(24): 64-67.

[16] 王晓林, 钟方丽, 薛健飞, 等. 酶法提取刺玫果总黄酮工艺研究[J]. 北方园艺, 2015(4): 136-139.

[17] 陈月英, 王彦平, 孙瑞琳, 等. 葡萄皮原花青素酶法提取工艺优化及其抗氧化性研究[J]. 北方园艺, 2016(16): 129-132.

[18] 黄雨洋, 王振宇. 酶法辅助提取红松种壳多酚的工艺优化研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(4): 184-187, 192.

Enzymatic Extraction of Polyphenols From *Euodia rutaecarpa* and Its Antioxidant and Antibacterial Activities

WANG Minghua¹, SHAO Mingliang¹, GAO Ziyi², HAO Liqin², ZHAO Erlao²

(1. Department of Biology, Xinzhou Teachers University, Xinzhou, Shanxi 034000; 2. Department of Chemistry, Xinzhou Teachers University, Xinzhou, Shanxi 034000)

Abstract: *Euodia rutaecarpa* was used as the raw material, and based on the single-factor experiments, orthogonal experiment had been used to explore the operational conditions for enzymatic extraction technique of polyphenols from *Euodia rutaecarpa*. The antioxidant activity of extracted polyphenols had been appraised by investigating the DPPH • scavenging rate, and the antibacterial activity also had been estimated by filtering paper method. The results showed that the optimal technique of extracting process was as follows, extraction temperature 60 °C, extraction time 2.5 hours, cellulase concentration 0.25 mg • mL⁻¹, pH 4.0. Under these conditions, the extraction rate of polyphenols was 5.58%. Although the DPPH • scavenging rate of polyphenols was lower than vitamin C, the polyphenols had certain antioxidant activity. The polyphenols exhibited certain inhibitory effect on chosen bacteria, *Escherichia coli* > *Bacillus subtilis* > *Staphylococcus aureus*. The polyphenols from *Euodia rutaecarpa* possessed natural antioxidant and food preservatives applications, and was worthy of further development.

Keywords: *Euodia rutaecarpa*; polyphenols; enzymatic extraction technique; antioxidant activity; antibacterial activity